D-阿洛酮糖 3-差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及固定化细胞研究¯

孙帆[1,2,3] 宿玲恰[1,2,3] 张康[1,2,3] 吴敬[1,2,3,**]

([1]江南大学 食品科学与技术国家重点实验室 无锡 214122

[2]江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡214122

[3]江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室 无锡214122)

摘要 将来源于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 DPEase 基因在食品级表达系统 *Bacillus subtilis* 中进行产酶研究，在 3-L 发酵罐中高密度发酵最终酶活可达 495 U/mL，得到高表达量的 DPEase 酶液。通过硅藻土-海藻酸钠（吸附包埋法）对重组细胞进行固定化研究，结果表明，当海藻酸钠浓度 2%，细胞包埋量 50 g/L，$CaCl_2$ 浓度 2%，硅藻土浓度 1%时，固定化细胞酶活回收率可达 64%，固定化细胞与游离细胞相比最适 pH 不变，最适温度提高 5℃，热稳定性明显提高，连续反应 7 个批次后转化率仍然为 28%，仍保持 81%的残余酶活，具有很高的工业应用价值。

关键词 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶，枯草芽孢杆菌，高密度发酵，固定化细胞

Key words D-psicose 3-epimerase, *Bacillus subtilis*, High-cell-density fermentation, Immobilized cells

D-psicose 3-epimerase Gene Overexpression in *Bacillus subtilis* and Immobilization of Cells

SUN Fan[1,2,3] SU Ling-qia[1,2,3] ZHANG Kang[1,2,3] WU Jing[1,2,3,**]

([1]State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, 1800 Lihu Avenue, Wuxi, 214122, China

[2]School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, 1800 Lihu Avenue, Wuxi, 214122, China

[3]International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, 1800 Lihu

---

¯国家自然科学基金（31501419）、国家杰出青年基金（31425020）

** 通讯作者，电子邮箱：jingwu@jiangnan.edu.cn

Avenue, Wuxi, 214122, China)

Abstract The DPEase gene from *Clostridium cellulolyticum* H10 was studied on the enzyme production in the food grade expression system *Bacillus subtilis*. The final enzyme activity was 495 U/mL by high-cell-density fermentation in the 3-L fermentor. The recombinant cells were immobilized by diatomite-sodium alginate (adsorption-occlusion method), the optimized immobilized conditions were as follows: 2% sodium alginate, 50 g/L cell concentration, 2% $CaCl_2$ and 1% diatomite. Under the optimum condition, the recovery rate reached 64%. Compared with the free cells, the immobilized cells had the same optimal pH, the optimal temperature was increased by 5 ℃, and the thermal stability was significantly improved. The conversion rate was still 28% after 7 times repeated operations, it also maintained 81% of the residual enzyme activity, which had a high industrial application value.

D-阿洛酮糖是 D-果糖的一种同分异构体，它的甜度是蔗糖的 70%，但是能量值只有蔗糖的 0.3%[1]，具有多种独特的营养学和生理性功能，例如零能量，可预防肥胖；降低血糖、血脂；膳食补充剂和甜味剂等[2-4]，受到越来越多研究者的注意。

D-阿洛酮糖在自然界中存在极少，目前一般用酶法转化生产 D-阿洛酮糖。D-阿洛酮糖 3-差向异构酶（DPEase）可催化 D-果糖 C3 位置差向异构化从而获得 D-阿洛酮糖。近年来，不同微生物来源的 DPEase 被发现并在不同宿主中克隆表达[5-7]。但是 D-阿洛酮糖作为一种食品添加剂，选择安全的宿主菌尤其重要。枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）作为一种食品安全菌，不存在内毒素等安全性问题，被广泛用于各种酶制剂的工业化生产中[8, 9]。但是在 DPEase 的工业化生产中存在表达量低的问题，无法满足生产需要。2016 年，来自天津的孙媛霞团队[10]构建了一株含有木糖诱导性启动子的重组 DPEase 蛋白，并在枯草芽孢杆菌中成功表达，最后在 7.5-L 发酵罐中酶活和蛋白表达量分别为 95 U/mL 和 2.6 g/L，是目前国内外报道的最高水平。工业化生产中，如何通过高密度发酵获得高表达量的酶蛋白尤为重要。在传统的枯草芽孢杆菌分批补料发酵过程中，通常需要控制较低的残糖浓度来提高产物的产量[11-13]，这是因为当培养基中碳源底物丰富时，可能会对发酵产物产生阻遏现象，这一现象称为碳代谢阻

遏效应（CCR 效应）[14]。所以，采取合适的发酵策略获取高表达量的酶蛋白是工业化生产 D-阿洛酮糖的关键。

几乎所有的 DPEase 都存在稳定差的问题，大多数己酮糖 3-差向异构酶在低于 50℃时具有较好的热稳定性，当温度一旦升高，酶迅速失活。而且水溶性的酶液无法重复利用，同时由于 DPEase 基本都是胞内酶，破壁获得工业上所需的酶液往往成本较高，而且耗时费力。自上世纪六十年代以来，固定化技术被逐渐开发并广泛应用于食品、医药、环境等各个领域。王雪梅等人研究了海藻酸钠和聚丙烯酰胺复合载体包埋镰孢霉菌细胞拆分 D，L-泛解酸内酯[15]，该固定化方法最终酶活回收率可达 80％以上；付凤根等以海藻酸钙为载体包埋大肠杆菌细胞催化生产 D-塔格糖，连续转化 8 个批次的平均转化率仍保持在 60.6％[16]。通过固定化细胞制备 D-阿洛酮糖不仅避免了破壁所带来的麻烦，同时也提高了酶的利用率和稳定性。江南大学江波团队通过海藻酸钠包埋大肠杆菌细胞产 D-阿洛酮糖重复操作 8 次后回收率仍保持 61％[17]。

本研究中，将前期构建的来源于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 DPEase 基因转化 *B. subtilis* strain CCTCC M 2016536 中实现表达。通过分批补料发酵获得高表达量的目的蛋白，最后我们探索了吸附-包埋法（硅藻土-海藻酸钠）对重组枯草芽孢杆菌固定化条件的研究，获得了一种固定化细胞产 D-阿洛酮糖的方法，具有很高的工业化应用价值。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株与质粒

重组菌 *B. subtilis*/pHY300PLK-DPEase 由实验室前期构建。

1.1.2　试剂

蛋白电泳试剂和蛋白分子量 Mark 均购自上海生物工程有限公司；D-阿洛酮糖标样购自 Sigma 公司；其他常规试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3　培养基

种子培养基 LB (g/L)：酵母粉 5，蛋白胨 10，NaCl 10，四环素终浓度 20 mg/L。

3-L 发酵罐培养基 (g/L)：大豆蛋白胨 20，玉米浆 15，柠檬酸铵 1，甘油 5，K_2HPO_4 12.54，KH_2PO_4 2.31，$MgSO_4·7H_2O$ 1，$CaCl_2$ 0.2，四环素终浓度 20 mg/L，微量元素液 3 mL。

补料培养基 (g/L)：甘油 500，$MgSO_4·7H_2O$ 7.89，大豆蛋白胨 20，玉米浆 10，微量元素液 20 mL。

微量元素 TES (g/L)： $CaCl_2$ 0.5，$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$ 0.18，$MnSO_4 \times H_2O$ 0.1，Na_2-EDTA 10.05，$FeCl_3$ 8.35，$CuSO_4 \times 5\ H_2O$ 0.16，$CoCl_2 \times 6\ H_2O$ 0.18。

1.2 方法

1.2.1 重组菌在 3-L 发酵罐中发酵产 DPEase

种子培养：从-80℃保存的甘油管中接 2‰的菌液至含有四环素的 LB 液体培养基（种子培养基）中，37℃、200 r/min，培养 8-10 h。

3-L 罐高密度发酵：3-L infors 发酵罐初始装液量 0.9 L，初始 pH 7.0，溶氧校准至 100%，将 100 mL 种子培养基接种至发酵罐中，并加入终浓度 20 mg/L 的四环素。33℃恒温发酵，用 20%的磷酸和氨水控制 pH 7.0 左右。当初始培养基中甘油耗尽时，会出现溶氧突然地上升和转速的下降，此时开始恒速补料。发酵过程中，通过转速和溶氧偶联使溶氧维持在 30%。

超声破壁：用 20 mmol/L，pH8.0 的 HEPES 缓冲液将细胞沉淀复溶到 OD_{600} 为 5（1 mL 体系），加入 30 μL 溶菌酶（20 mg/mL）37℃处理 30 min，用超声破碎仪进行破壁，然后离心取破壁上清检测 DPEase 表达情况。

1.2.2 DPEase 酶活测定方法

将 200 μL 适当稀释的酶液加入到 800 μL 含有果糖的 HEPES 缓冲液（20 mmol/L，pH8.0，0.1 mmol/L Co^{2+}）中，使果糖终浓度 80 g/L。振荡混匀后置于 55℃水浴锅中反应 10 min，煮沸 10 min 灭酶终止反应。样品离心过膜后，经高效液相色谱（HPLC）分析检测 D-阿洛酮糖，检测器为示差检测器。

游离细胞酶活力测定方法：将适量菌体加入到 1 mL 上述反应体系中，55℃反应 10 min，沸水浴 10 min 灭酶终止反应。

固定化细胞酶活力测定方法：称取 0.5 g 固定化微球，加入到 10 mL 上述反应体系中，55℃反应 10 min，取上清沸水浴 10 min 灭酶。

酶活单位定义：在 pH 8.0 ，55 ℃环境下，每分钟内产生 1 μmoL 的 D-阿洛酮糖（D-psicose）为一个酶活单位。

酶活回收率：固定化细胞的总活力与用于固定化细胞的游离细胞总活力的百分率。

1.2.3　固定化细胞及固定化条件的优化

称取一定质量的海藻酸钠加水 8 mL，加热溶解，冷却后加入 2 mL 菌悬液，充分搅拌混合均匀，然后用带针头的注射器将上述混合液以 60 滴/min 的速度滴入 $CaCl_2$ 溶液中，形成大小均一的固定化微球，4℃静置硬化 3 h 后，用去离子水洗涤 3 次后保存在生理盐水中。

采用单因素实验，控制一个因素不变，分别改变海藻酸钠浓度、细胞包埋量、$CaCl_2$ 浓度、硅藻土浓度来考察各个因素对固定化细胞效果的影响。

1.2.4　固定化细胞和游离细胞的最适 pH 和温度

配置不同 pH 的 HEPES 缓冲液（6.0-9.0），称取 0.5 g 固定化微球，按固定化细胞酶活测定方法，确定固定化细胞最适的 pH，同时用适当菌体代替固定化微球确定游离细胞的最适反应 pH。

在最适的 pH 条件下，分别称取 0.5 g 微球和适当菌体，在不同反应温度下（45-80℃）测定酶活，确定固定化细胞和游离细胞的最适反应温度。

1.2.5　固定化细胞的温度稳定性和操作稳定性

称取一定质量的固定化微球，加入到 10 mL 300 g/L 的果糖反应体系（pH 8.0，0.1 mmol/L Co^{2+}）中，于 55℃水浴摇床，以 100 rpm 反应 3 h，反应结束后用去离子水清洗固定化微球三次后重复上述操作，连续反应 7 个批次，分别计算转化率与残留酶活。

2　结果与讨论

2.1　3-L 罐中高密度发酵产 DPEase

本实验在 3-L 发酵罐中考察了重组枯草芽孢杆菌生长和产酶情况。如图 1 所示，重组菌在发酵罐中一直处于稳定的生长阶段，但是重组菌的胞内酶活却呈现先增加而后趋于稳定的状态，当重组菌发酵 32 h 后其胞内酶活基本达到平衡，最高酶活可达 495 U/mL。通过重组菌在 3-L 罐中高密度发酵，获得了高表达量的 DPEase。

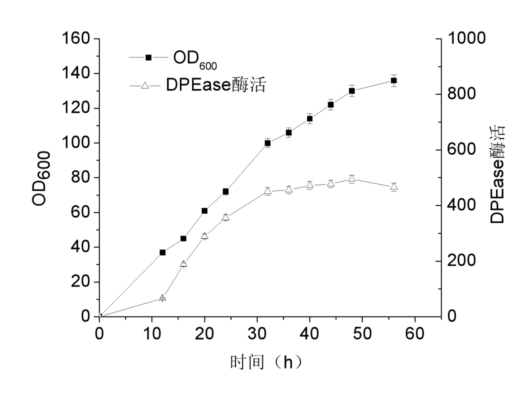
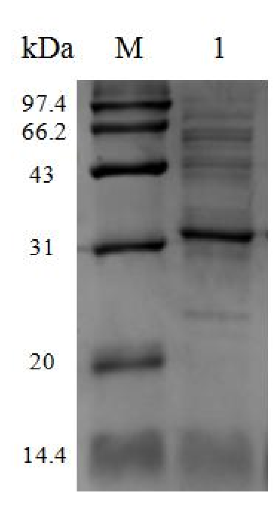


图 1 重组菌在 3-L 罐中生长和产酶过程

Fig.1　OD_{600} and DPEase activity of the recombinant strain in the 3-L fermentor

将发酵液稀释到 OD_{600} 为 5 后，离心，菌体用缓冲液悬浮均匀后，超声破碎仪进行细胞破碎，离心取胞内上清酶液，SDS-PAGE 蛋白电泳（图 2）显示，在 33kDa 处有目的蛋白条带，与理论的 DPEase 分子质量符合。



M – 蛋白质 Marker；1– 重组菌破壁上清液

图 2 DPEase SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the DPEase

2.2 硅藻土-海藻酸钠固定化细胞条件的优化

2.2.1 海藻酸钠浓度对固定化细胞的影响

海藻酸钠浓度影响固定化微球的机械强度、传质速度等，从而影响固定化细胞的酶活回收率。如图 3 所示，酶活回收率随着海藻酸钠浓度的增加呈现先升高后降低的现象。当海藻酸钠浓度过低时，产生的固定化微球结构孔径大，机械强度差，在包埋过程中细胞容易流失，导致酶活回收率低；但是当海藻酸钠浓度过高时，载体材料溶解困难，推压注射器费力且产生的固定化微球形状不规则，容易拖尾。综合考虑，当海藻酸钠浓度为 2%时，酶活回收率最高，且产生的微球形状规则，机械强度良好。

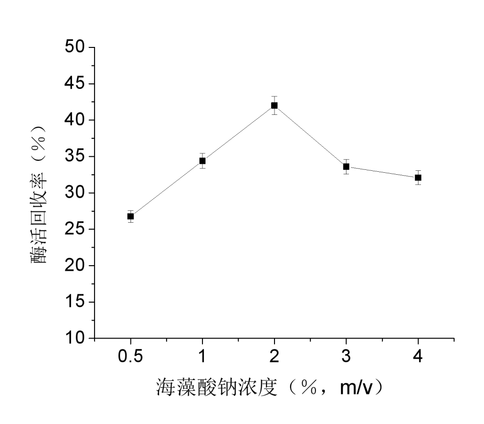


图 3 海藻酸钠浓度对固定化细胞酶活回收率的影响

Fig.3 Effects of sodium alginate amount on enzyme activity recovery of immobilized cells

2.2.2 包埋细胞浓度对固定化细胞的影响

固定化载体与包埋细胞浓度的比例可能影响酶活回收率。包埋细胞浓度过高可能超过载体的负荷，导致酶活回收率降低。如图 4 所示，固定化细胞的酶活回收率随着包埋菌体浓度的增加而增加，但是当菌体包埋量大于 50 g/L 时，酶活回收率急剧下降，这时候可能载体中的细胞分子密度过高，位阻效应增加，在固定化过程中部分细胞从载体中渗透出去，导致酶活回收率降低。所以选取 50 g/L 的细胞包埋量作为固定化细胞的最适条件。

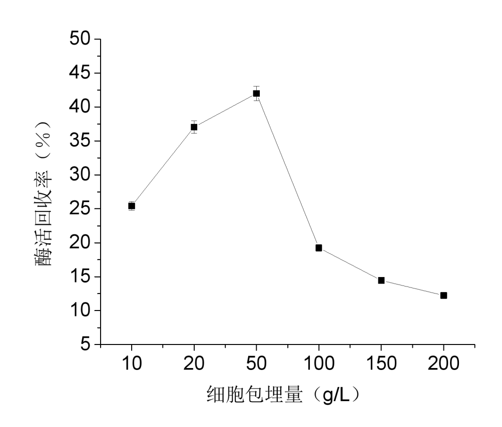


图 4 细胞包埋量对固定化细胞酶活回收率的影响

Fig.4 Effects of cell concentration on enzyme activity recovery of immobilized cells

2.2.3 $CaCl_2$浓度对固定化细胞的影响

$CaCl_2$浓度可能影响固定化微球的硬化效果，浓度过低时微球的硬化效果差，细胞容易流失，且机械强度差，不利于连续反应；$CaCl_2$浓度过高时形成紧密的网状空间结构不利底物分子的进出，同时由于 DPEase 是一种金属依赖性酶，高浓度的 Ca^{2+}对 DPEase 的活性损失较大，所以如图 5 所示，最佳的 $CaCl_2$硬化浓度为 2%。

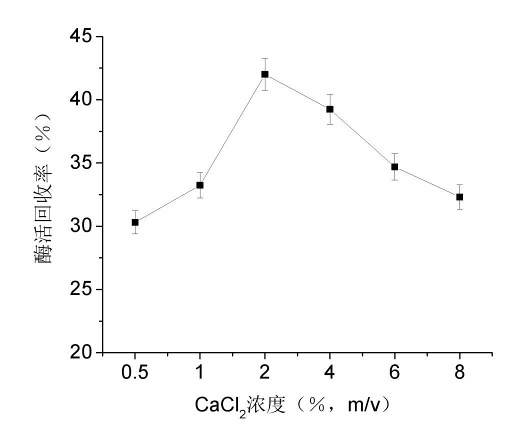


图 5 $CaCl_2$浓度对固定化细胞酶活回收率的影响

Fig.5 Effects of $CaCl_2$ concentration on enzyme activity recovery of immobilized cells

2.2.4 硅藻土浓度对固定化细胞的影响

有研究表明，硅藻土作为改性介质能改善固定化微球的形状结构，提高其机械强度。如图 6 所示，当添加 1%的硅藻土时可明显改善固定化细胞的酶活回收率。这可能是当采用硅藻土-海藻酸钠（吸附-包埋法）共固定化细胞时，不仅使细胞固定的更加牢固，防止细胞脱落，同时硅藻土也可使原本致密的载体结构变得相对疏松，更加有利于传质和底物分子的进出，加快反应速率。硅藻土浓度为 1%时，酶活回收率为 64%。所以添加 1%的硅藻土作为改性介质共固定化细胞。

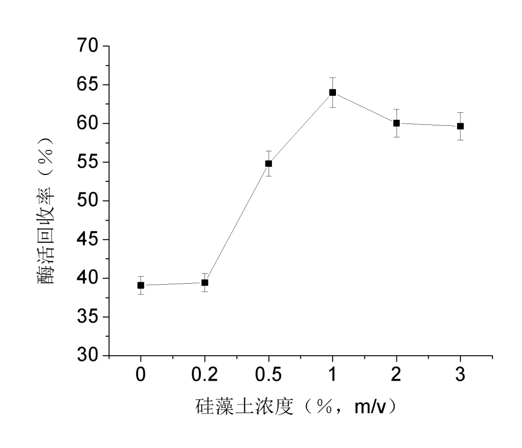


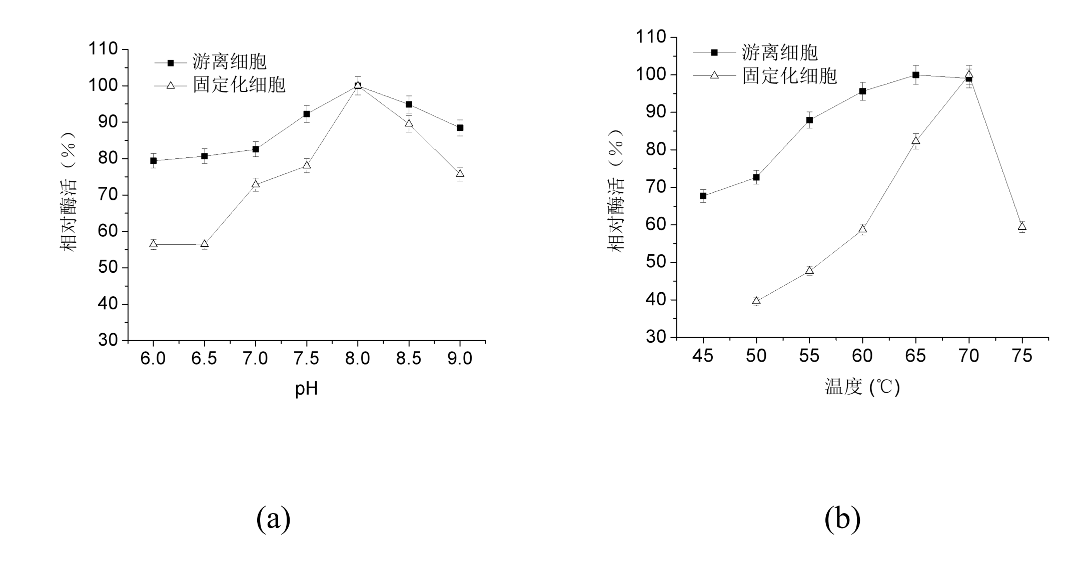
图 6 硅藻土浓度对固定化细胞酶活回收率的影响

Fig.6 Effects of diatomite concentration on enzyme activity recovery of immobilized cells

2.3　固定化细胞的酶学性质及操作稳定性研究

2.3.1　固定化细胞最适反应 pH 与温度

在本研究中，我们考察了游离细胞和固定化细胞的最适反应条件。如图 7(a) 所示，在不同 pH 的缓冲体系中（pH 6.0-9.0）测定固定化细胞和游离细胞的 DPEase 酶活，以最高酶活为相对酶活 100%，结果表明游离细胞和固定化细胞的最适 pH 相同，都为 8.0；如图 7(b)，将游离细胞和固定化细胞分别在 45℃-75℃下反应，测定 DPEase 酶活，结果显示固定化细胞的最适反应温度为 70℃，相对于游离细胞提高了 5℃。



(a) (b)

图 7 固定化细胞与游离细胞的最适 pH 和最适温度

Fig.7 The optimum pH(a) and temperature(b) of the immobilized cells and free cells

2.3.2 固定化细胞热稳定性和操作稳定性的研究

固定化细胞跟游离细胞相比，有较好的操作稳定性和重复使用性。本实验将固定化微球于 55℃、100 rpm 下进行连续转化，经过预实验确定反应时间为 3 h。待一次反应结束后，去除反应液并测定 D-阿洛酮糖转化率，并用去离子水洗涤 3 次后加入新鲜的反应液进行下一批次的转化。如图 8 所示，固定化细胞的转化率呈现先增加而后稳定的趋势，这可能是因为在最初的反应过程中高温使固定化微球出现明显溶胀，增加了微球与底物的反应面积，有利于加快反应速率。经过连续反应 7 个批次，固定化细胞的转化率仍能维持在 28%；而残留酶活有些许下降，但是仍保持 81%的残留酶活，这是由于在连续反应过程中机械作用力和高温使微球发生溶胀，细胞流失而且伴随部分微球出现破裂的现象导致残留酶活的降低。由此可见，固定化细胞显示出良好的热稳定性和连续转化能力。

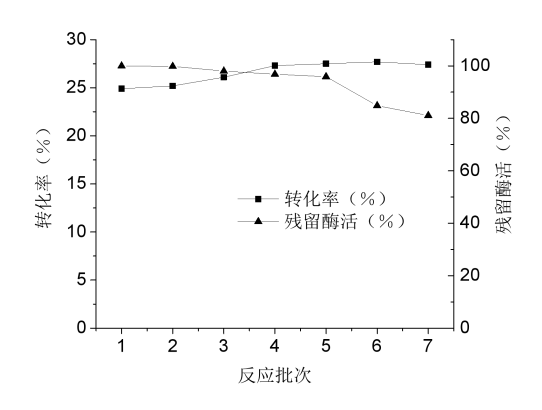


图 8 固定化细胞的操作稳定性

Fig.8 The operational stability of immobilized cells

3 结论

本实验研究了来源于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 DPEase 基因在 *B. subtilis* 中的表达情况，通过在 3-L 发酵罐中高密度发酵，最高酶活达到 495 U/mL，最终得到一株高产 DPEase 酶蛋白的菌株。由于 DPEase 是一个胞内酶，破壁得到工业化所需的大量酶液不仅耗时费力，而且成本较高，相对而言通过固定化细胞生产 D-阿洛酮糖避免了粗酶提取带来的麻烦，同时也提高了酶的利用率和稳定性。通过对固定化重组 DPEase 细胞的条件优化，结果表明，最优条件为海藻酸钠浓度 2%，细胞包埋量 50 g/L，$CaCl_2$ 浓度 2%，硅藻土浓度 1%。该条件下固定化细胞的酶活回收率可达 64%，连续转化 7 个批次后，仍保持 28%的转化率和 81%的残留酶活，结果表明固定化细胞热稳定性明显提高（游离酶在 55℃下半衰期为 3 h），同时具有良好的操作稳定性，显示该方法有很高的工业应用价值。

参考文献

[1] Matsuo T, Suzuki H, Hashiguchi M, et al. D-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats[J]. J Nutr Sci Vitaminol. 2002,48(1):77-80.

[2] Iida T, Hayashi N, Yamada T, et al. Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans[J]. Metabolism: clinical and experimental. 2010,59(2):206-214.
[3] Nagata Y, Kanasaki A, Tamaru S, et al. D-psicose, an epimer of D-fructose, favorably alters lipid metabolism in Sprague-Dawley rats[J]. J Agric Food Chem. 2015,63(12):3168-3176.
[4] Zunino S. Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products[J]. The Journal of nutrition. 2009,139(9):1794S-800S.
[5] Kim HJ, Hyun EK, Kim YS, et al. Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* D-psicose 3-epimerase that converts D-fructose to D-psicose[J]. Applied and environmental microbiology. 2006,72(2):981-985.
[6] Mu W, Chu F, Xing Q, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10[J]. J Agric Food Chem. 2011,59(14):7785-7792.
[7] Zhu Y, Men Y, Bai W, et al. Overexpression of D-psicose 3-epimerase from *Ruminococcus sp.* in *Escherichia coli* and its potential application in D-psicose production[J]. Biotechnology letters. 2012,34(10):1901-1906.
[8] Boer ASd, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review[J]. Applied microbiology and biotechnology. 1991,36(1):1-4.
[9] 李静静, 徐美娟, 张显等. 一种耐低温乙酰乳酸脱羧酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达[J]. 食品与生物技术学报. 2013,32(5):516-523.
Li Jing-jing, Xu Mei-juan, Zhang Xian, et al. High-level Expression of Cold- Adapted acetolactate Decarboxylase in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology. 2013,32(5):516-523.[10] Chen J, Zhu Y, Fu G, et al. High-level intra- and extra-cellular production of D-psicose 3-epimerase via a modified xylose-inducible expression system in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2016,43(11):1577-1591.
[11] Huang H, Ridgway D, Gu T, et al. Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy[J]. Bioprocess and biosystems engineering. 2004,27(1):63-69.
[12] Shene C, Mir N, Andrews BA, et al. Effect of the growth conditions on the synthesis of a recombinant β-1,4-endoglucanase in continuous and fed-batch culture[J]. Enzyme and Microbial Technology. 2000,27(3-5):248-253.
[13] Zhu Y, Liu Y, Li J, et al. An optimal glucose feeding strategy integrated with step-wise regulation of the dissolved oxygen level improves N-acetylglucosamine production in recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Bioresource technology. 2015,177:387-392.
[14] Bruckner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization[J]. FEMS Microbiology Letters. 2002,209(2):141-148.
[15] 王雪梅, 于明锐, 谭天伟. 海藻酸钠复合载体固定化细胞拆分 D,L-泛解酸内酯[J]. 北京化工大学学报. 2006,33(3):28-32.
Wang Xue-mei, Yu Ming-rui, Tan Tian-wei. Immobilization of fusarium oxysporum BU-11 cells by alginate composite for optical resolution of racemic DL-pantolactone[J]. Journal of Beijing University of chemical technology. 2006,33(3):28-32.
[16] 付凤根, 徐铮, 李贵祥等. 利用固定化重组大肠杆菌细胞生产 D-塔格糖[J]. 中国生物工程杂志. 2011,31(7):85-90.

Fu Feng-gen, Xu Zheng, Li Gui-xiang, et al. D-tagatose Production Utilizing Immobilized Recombinant *Escherichia coli cells*[J]. China Biotechnology. 2011,31(7):85-90.
[17] 李秋喜, 林春芳, 沐万孟等. 海藻酸钠固定细胞产 D-阿洛酮糖的研究[J]. 食品工业科技. 2015,10(7):172-176.
Li Qiu-xi, Lin Chun-fang, Mu Wan-meng, et al. Research of the immobilization of microbial cells in sodium alginate for D-psicose conversion[J]. Science and Technology of Food Industry. 2015,10(7):172-176.